



IFW

PATENT  
2798-1-001

**IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE**

APPLICANTS : Francisco Javier Canada Vicinay *et al*  
SERIAL NO. : 10/738,378 ART UNIT: 1614  
FILED : December 17, 2003  
FOR : **ENZYMATIC METHOD OF PRODUCING 4-O- $\beta$ -D-  
GALACTOPYRANOSYL-D-XYLOSE, 4-O- $\beta$ -D-  
GALACTOPYRANOSYL-D-XYLOSE OBTAINED  
USING SAID METHOD, COMPOSITIONS CONTAIN  
SAME AND THE USE THEREOF IN EVALUATING  
INTESTINAL LACTASE**

**CERTIFICATE OF MAILING UNDER 37 CFR 1.8**

I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to the Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 on

June 7, 2005

Lois A. Snure  
(Name of Depositor)

Lois A. Snure 6/7/05  
(Signature and Date)

**PETITION FOR GRANT OF PRIORITY UNDER 35 USC 119**

Commissioner for Patents  
P.O. Box 1450  
Alexandria, VA 22313-1450

Dear Sir:

Applicant hereby petitions for grant of priority of the present Application on the basis of the following prior filed foreign Application:

<u>COUNTRY</u>	<u>SERIAL NO.</u>	<u>FILING DATE</u>
SPAIN	200101419	JUNE 18, 2001

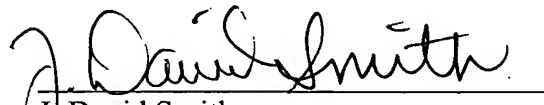
To perfect Applicant's claim to priority, a certified copy of the above listed prior filed Application is enclosed.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

PATENT  
2798-1-001

Acknowledgment of Applicant's perfection of claim to priority is accordingly requested.

Respectfully submitted,

  
J David Smith  
Attorney for Applicant  
Registration No. 39,839

KLAUBER & JACKSON  
411 Hackensack Avenue  
Hackensack, NJ 07601  
(201)487-5800

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



MINISTERIO  
DE INDUSTRIA, TURISMO  
Y COMERCIO



Oficina Española  
de Patentes y Marcas

## CERTIFICADO OFICIAL

Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de la solicitud de PATENTE de INVENCION número 200101419 , que tiene fecha de presentación en este Organismo 18 de Junio de 2001

Madrid, 12 de Agosto de 2004

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

El Director del Departamento de Patentes  
e Información Tecnológica

P.D.

MIGUEL HIDALGO LLAMAS

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



MINISTERIO  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA  
MJP



Oficina Española  
de Patentes y Marcas



# INSTANCIA DE SOLICITUD

RO DE SOLICITUD

P200101419

(1) MODALIDAD:

☒ PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE U

(2) TIPO DE SOLICITUD:

- ☐ ADICIÓN A LA PATENTE  
☐ SOLICITUD DIVISIONAL  
☐ CAMBIO DE MODALIDAD  
☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA  
☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN.

MODALIDAD

N.º SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

HA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:  
MADRID

CÓDIGO

28

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNI/CIF

CNAE

PYME

1º) CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIEN-  
TÍFICAS

2º) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
MADRID

ESPAÑOLA

ES

Q-2818002D

ESPAÑOLA

ES

Q-2818013-A

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO Serrano, nº 113

LOCALIDAD MADRID

PROVINCIA MADRID

PAÍS RESIDENCIA ESPAÑA

NACIONALIDAD ESPAÑOLA

TÉLEFONO

FAX

CORREO ELECTRÓNICO

CÓDIGO POSTAL

CÓDIGO PAÍS

CÓDIGO PAÍS

28006

ES

ES

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

CAÑADA VICINAY  
CORRALES MORALES  
FERNÁNDEZ-MAYORALAS

FRANCISCO JAVIER  
GUILLERMO  
ALFONSO

ESPAÑOLA  
ESPAÑOLA  
ESPAÑOLA

ES  
ES  
ES

(8) ☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVENC. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

UN PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO PARA OBTENER 4-0- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-XILOSA, 4-0- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-XILOSA OBTENIDA DE ACUERDO CON EL PROCEDIMIENTO, COMPOSICIONES QUE LA CONTIENEN Y SU USO EN LA EVALUACIÓN DE LA LACTASA INTESTINAL

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI ☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE/REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLÉNESE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

D.JAVIER UNGRIA LOPEZ (392/1)  
Avda. Ramón y Cajal, 78  
28043 - MADRID

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

- ☒ DESCRIPCIÓN N.º DE PÁGINAS: 24  
☒ N.º DE REIVINDICACIONES: 44  
☐ DIBUJOS. N.º DE PÁGINAS:  
☐ LISTA DE SECUENCIAS N.º DE PÁGINAS:  
☒ RESUMEN  
☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD  
☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD
- ☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN  
☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD  
☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA  
☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS  
☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN  
☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

JAVIER UNGRIA

p.p.

(VER COMUNICACIÓN AL DORSO)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.



OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

NUMERO DE SOLICITUD

P200101419

FECHA DE PRESENTACION

HOJA INFORMACIONES COMPLEMENTARIAS

- ☐ PATENTE DE INVENCION  
☐ MODELO DE UTILIDAD

(4) SOLICITANTES	APELLIDOS O RAZON SOCIAL	NOMBRE	DNI
(6) INVENTORES	APELLIDOS	NOMBRE	NAC.
MARTÍN-LOMAS ARAGÓN REYES		MANUEL JUAN JOSÉ	ES ES
(11) EXPOSICIONES OFICIALES			
LUGAR:		FECHA:	
(12) DECLARACIONES DE PRIORIDAD			
PAIS DE ORIGEN	CODIGO	NUMERO	FECHA





① NUMERO ③ PAIS		② PATENTE DE INVENCIÓN ④ NUMERO DE SOLICITUD <b>P200101419</b> ⑤ FECHA DE PRESENTACION 18-6-2001
--------------------	--	--

⑦ SOLICITANTE(S) NACIONALIDAD  
 1º) CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS ESPAÑOLA  
 2º) UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
 DOMICILIO 1º) Serrano, nº 113 - 28006 MADRID, 2º) Carretera Colmenar, Km.15 - Edificio Rectorado - 28049 MADRID

⑧ INVENTOR(ES) FRANCISCO JAVIER CAÑADA VICINAY, GUILLERMO CORRALES MORALES, ALFONSO FERNÁNDEZ-MAYORALAS, MANUEL MARTÍN-LOMAS y JUAN JOSÉ ARAGÓN REYES, todos ellos de nacionalidad española.

⑨ TITULAR(ES)

⑪ N.º DE PUBLICACION

⑫ FECHA DE PUBLICACION

⑬ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA

GRAFICO (SOLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)

⑭ Int. Cl. <sup>7</sup> C12Q1/34, C12P19/42, C07H3/04

⑮ TITULO

UN PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO PARA OBTENER 4-0-β-D-GALACTOPIRANOSIL-D-XILOSA, 4-0-β-D-GALACTOPIRANOSIL-D-XILOSA OBTENIDA DE ACUERDO CON EL PROCEDIMIENTO, COMPOSICIONES QUE LA CONTIENEN Y SU USO EN LA EVALUACIÓN DE LA LACTASA INTESTINAL.

⑯ RESUMEN (APORTACION VOLUNTARIA, SIN VALOR JURIDICO)

Un procedimiento enzimático para obtener 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa, 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida de acuerdo con el procedimiento, composiciones que la contienen y su uso en la evaluación de la lactasa intestinal.

Un procedimiento enzimático para obtener 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa útil, como tal o en composiciones o disoluciones, en la evaluación in vivo de la actividad lactasa intestinal en humanos, que comprende las etapas de

preparar una mezcla de reacción de D-xilosa, un β-D-galactopiranosido, y un medio de reacción que comprende agua tamponada a un pH entre 5.0 y 9.0; añadiéndose 10 a 1.000 unidades de β-D-galactosidasa por gramo de β-D-galactopiranosido;

someter la mezcla de reacción a una reacción a una temperatura entre una temperatura superior al punto de congelación de la mezcla de reacción y 45°C, durante 2 a 48 horas;

parar la reacción mediante desactivación de la β-D-galactosidasa; y

aislar y cristalizar, las fracciones que contienen 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa en una mezcla de cristalización seleccionada entre mezclas de acetona/metanol en una relación entre 5/1 a 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 a 20/1.

**TÍTULO DE LA INVENCION**

**UN PROCEDIMIENTO ENZIMÁTICO PARA OBTENER 4-O- $\beta$ -D-  
GALACTOPIRANOSIL-D-XILOSA, 4-O- $\beta$ -D-GALACTOPIRANOSIL-D-  
XILOSA OBTENIDA DE ACUERDO CON EL PROCEDIMIENTO,  
5 COMPOSICIONES QUE LA CONTIENEN Y SU USO EN LA EVALUACIÓN  
DE LA LACTASA INTESTINAL**

La presente invención está comprendida en el campo de los procedimientos para obtener compuestos, concretamente disacáridos útiles en los métodos de  
10 evaluación incruentos de la actividad lactasa intestinal.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

La deficiencia o baja actividad en lactasa intestinal que resulta en una capacidad insuficiente o hasta nula para digerir lactosa, es rara como error  
15 metabólico congénito, pero es un síndrome común en humanos adultos. Sin embargo, en la mayor parte de los mamíferos existe una acusada disminución de la actividad lactasa desde el momento del destete. En humanos cuyos antepasados hayan dependido de un consumo sustancial de  
20 leche o productos lácteos durante largo tiempo, esta disminución es menos frecuente. Por otra parte, en lactantes es bastante infrecuente la deficiente o baja actividad en lactasa intestinal.

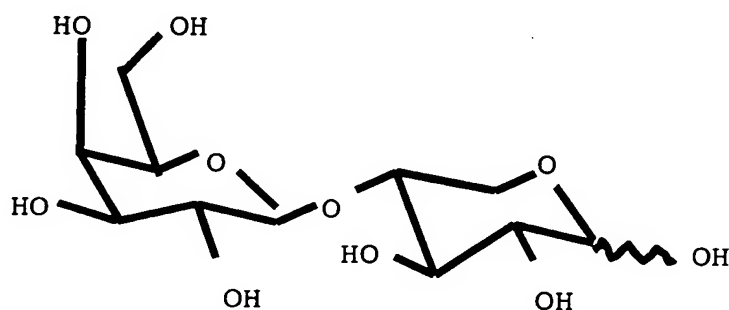
La determinación de la actividad lactasa intestinal  
25 es de importancia en pediatría y gastroenterología y puede llevarse a cabo directamente, a partir de una muestra de mucosa, o indirectamente, a partir del nivel de glucosa en sangre o del hidrógeno espirado, después de la administración de una dosis de lactasa al individuo.

30 La determinación directa tiene la desventaja de constituir un método complejo y caro debido a que requiere instrumental específico y personal muy especializado para la práctica de la extracción de la muestra que deberá someterse a análisis posteriormente, a  
35 parte de resultar desagradable y no carente de peligro

para el individuo.

Otros métodos de determinación de la lactasa intestinal se basan en que determinados disacáridos son, en base a su afinidad a la lactasa, susceptibles de actuar como sustrato de la lactasa y se transforman, por acción de la enzima, en determinados monosacáridos que son absorbidos fácilmente por el intestino y eliminados por la orina.

En la patente española ES-P-9001680 se describe la preparación del disacárido 4-O- $\beta$ -galactopiranosil-D-xilosa de la fórmula (I)



para la evaluación de la actividad lactasa intestinal. Dicho disacárido se administra oralmente, actúa como sustrato de la lactasa intestinal y por tanto se descompone, en el tracto intestinal, en xilosa y galactosa, siendo absorbida la xilosa y eliminada por la orina en la que la xilosa puede evaluarse directamente mediante un método colorimétrico simple.

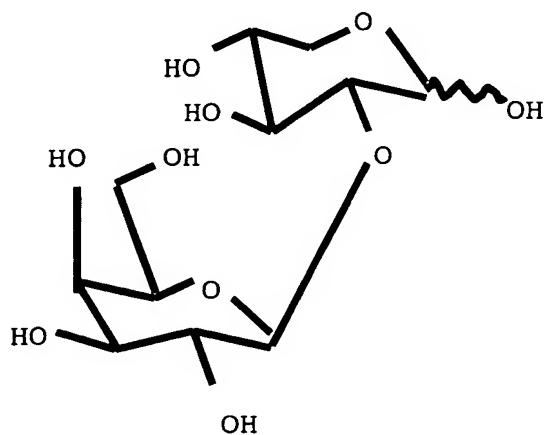
Las cantidades de xilosa excretadas en orina están correlacionadas con los niveles de lactasa intestinal.

La patente española ES-P-9001680 también describe un método de preparación básicamente para la 4-O- $\beta$ -

galactopiranosil-D-xilosa, que comprende una síntesis a partir de bencil  $\beta$ -D-xilopiranosido y que sigue una secuencia de operaciones que implica reacciones de protección selectiva, glicosilación y desprotección.

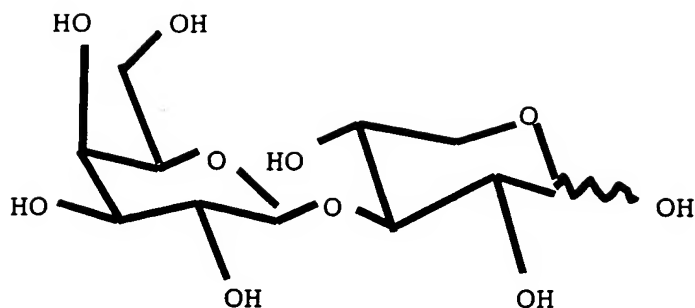
5 Tanto el número de etapas de reacción, como la utilización de reactivos caros tales como el triflato de plata en la reacción de glicosilación, y el empleo de columnas de cromatografía en la purificación de intermedios y del producto final, producen costes y  
10 presentan dificultades para llevar a cabo este procedimiento a escala industrial.

Las patentes españolas ES-P-9502185 y ES-P-9701156 describen procedimientos enzimáticos para la preparación de mezclas de disacáridos galactopiranosil-xilosas que  
15 contienen el disacárido (I) y sus regioisómeros 2-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa y la 3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa que, respectivamente, presentan las siguientes fórmulas



(II)

5



(III)

10 Los procedimientos descritos en las patentes  
 españolas ES-P-9502185 y ES-P-9701156 permiten obtener en  
 una sola etapa de reacción y tras purificación  
 cromatográfica, mezclas de 2-, 3- y 4-O-β-D-  
 galactopiranosil-D-xilosa útiles como sustratos y, por  
 15 tanto, para la determinación de la actividad de la enzima  
 lactasa intestinal. Dichos procedimientos, aunque viables  
 a partir de sustratos y enzimas asequibles, presentan  
 dificultades, desde el punto de vista de la síntesis  
 industrial, en cuanto a la caracterización de las  
 20 proporciones más adecuadas, la reproducibilidad de la  
 preparación en dichas proporciones y la determinación de  
 posibles impurezas.

Por otra parte, Gorin et al. en "The Synthesis of β-  
 Galacto- And β-Gluco-Pyranosyl Disaccharides by  
 25 *Sporobolomyces Singularis*", Can. J. Chem. 42(1964) 2307-  
 2319, describen la síntesis de una pluralidad de  
 disacáridos, entre ellos 2-O-β-D-galactopiranosil-D-  
 xilosa y la 3-O-β-D-galactopiranosil-D-xilosa, mediante  
 un procedimiento utilizando células. En esta publicación  
 30 no se describe ninguna utilidad de los diversos  
 disacáridos sintetizados.

#### **OBJETO DE LA INVENCION**

Es un primer objeto de la presente invención superar  
 los inconvenientes del estado de la técnica anteriormente  
 35 descrito.

Es otro objeto de la invención, proporcionar un procedimiento mejorado que implica una reacción enzimática entre D-xilosa y un sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido y una posterior fase de aislamiento y purificación, que permite aumentar la proporción de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa en la mezcla final de la reacción enzimática frente a los disacáridos 2- y 3-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, a partir de cuya mezcla final puede aislarse la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa mediante operaciones simples.

La 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa que puede obtenerse mediante el procedimiento anteriormente mencionado así como las composiciones que comprenden dicha 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, constituyen ulteriores objetos de la invención.

Es otro objeto de la invención usar la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa en la preparación de composiciones y disoluciones útiles en la evaluación *in vivo* de la actividad lactasa intestinal.

#### 20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los objetos anteriormente mencionados se consiguen de acuerdo con la presente invención, mediante un procedimiento enzimático para obtener 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa que comprende

25 una primera etapa en la que se prepara una primera mezcla de reacción de

2-20 % en peso de D-xilosa

0,5-5% en peso de un sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido

30 75-97,5 % en peso de un medio de reacción que comprende agua tamponada a un pH entre 5.0 y 9.0;

añadiéndose 10 a 1.000 unidades de una enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, por gramo de  $\beta$ -D-galactopiranosido a la primera mezcla de reacción; y obteniéndose una segunda  
35 mezcla de reacción;

una segunda etapa en la que la segunda mezcla de reacción se somete a una reacción a una temperatura comprendida entre una temperatura superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción y 45°C, durante 2 a 48 horas, para formar disacáridos en la segunda mezcla de reacción;

una tercera etapa en la que se para la reacción cuando se han formado los disacáridos en la cantidad deseada, mediante un tratamiento elegido entre una desactivación de la  $\beta$ -D-galactosidasa por congelación de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre -20°C y -170°C, una desactivación de la  $\beta$ -D-galactosidasa por calentamiento de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre 95 y 110°C, y una separación de la  $\beta$ -D-galactosidasa de la segunda mezcla de reacción por ultrafiltración; obteniéndose una tercera mezcla de reacción;

una cuarta etapa en la que se separa de la tercera mezcla de reacción, mediante extracción o filtración, un fragmento aglicónico del sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido usado en la primera etapa; obteniéndose una cuarta mezcla de reacción;

una quinta etapa en la que se aíslan fracciones que contienen 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, seleccionada entre

una adición de celita a la cuarta mezcla de reacción, seguida de extracción sólido-líquido con un disolvente y elución con un primer eluyente en una columna;

y una adición directa de carbón activo a la cuarta mezcla de reacción seguida de filtración y elución con un segundo eluyente,

y una sexta etapa, las fracciones que contienen 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se cristalizan en una mezcla de cristalización seleccionada entre mezclas de

acetona/metanol en una relación entre 5/1 a 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 a 20/1.

De acuerdo con la invención, la proporción de D-xilosa en la segunda mezcla de reacción es preferentemente de 7,5% en peso, la proporción del  $\beta$ -D-galactopiranosido en la segunda mezcla de reacción es de 1,5% en peso, y se añaden 100 unidades de  $\beta$ -D-galactosidasa, por gramo de  $\beta$ -D-galactopiranosido.

Opcionalmente, el medio de reacción puede comprender además al menos un medio codisolvente seleccionado entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dioxano y mezclas de los mismos, preferentemente en una proporción del 20% referida al medio de reacción. En una realización de la invención, el medio de reacción está tamponado a pH 7.

La reacción convenientemente se lleva a cabo a temperatura constante, a fin de aumentar su reproducibilidad. En una realización del procedimiento de la invención, la temperatura de reacción es superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción e inferior a 40°C. En otra realización, la reacción se realiza a temperatura ambiente, lo cual permite buenos rendimientos sin necesidad de enfriar la segunda mezcla de reacción. La reacción también puede realizarse a -5°C, o a 37°C. La temperatura de reacción es preferentemente inferior a 0°C pero superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción.

De acuerdo con la invención, el sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido preferentemente se selecciona entre o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y lactosa. La enzima  $\beta$ -galactosidasa puede ser  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* o de *Kluyveromyces lactis* (como por ejemplo MAXILACT®). Cuando se usa Gal-ONP como sustrato se forma en la reacción o-nitrofenol que se elimina por extracción con acetato de etilo en el caso de que la reacción se pare por calentamiento, o bien se elimina por simple



filtración en el caso de que la reacción se pare por enfriamiento.

Cuando, en la tercera etapa del procedimiento la reacción se para mediante congelación de la segunda  
5 mezcla de reacción, se aplica preferentemente una temperatura de  $-78^{\circ}\text{C}$ . Por otra parte, cuando en la tercera etapa la reacción se para mediante calentamiento de la segunda mezcla de reacción, se aplica preferentemente una temperatura de  $100^{\circ}\text{C}$ .

10 En la quinta etapa, la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa puede aislarse de la mezcla de reacción, mediante varios métodos alternativos.

Según un primer método alternativo, se elimina el agua de la cuarta mezcla de reacción para obtener un  
15 residuo de reacción que contiene los disacáridos, se somete el residuo de reacción a un tratamiento de acetilación para obtener un derivado peracetilado de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, y a una separación del derivado peracetilado en columna cromatográfica en gel de  
20 sílice. La acetilación del residuo de reacción se realiza preferentemente con anhídrido acético en piridina, mientras que, preferentemente, la desacetilación del derivado peracetilado se realiza catalíticamente con metóxido sódico en metanol.

25 Según un segundo método alternativo, la cuarta mezcla de reacción se somete a una elución en columna con un primer eluyente que puede seleccionarse entre mezclas de agua con metanol, etanol o isopropanol, preferentemente una mezcla agua/isopropanol con una  
30 proporción de isopropanol de 1 a 10% (v/v), preferentemente del 2% (v/v).

La elución se lleva a cabo en una columna de filtración seleccionada entre columnas de filtración con  
35 rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, como por ejemplo una columna con relleno de SEPHADEX, columnas

de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, como por ejemplo una columna con relleno de BIOGEL, y columnas de filtración de carbón activo o de carbón activo-celita, para obtener fracciones que contienen 4-  
5 0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa.

Preferentemente, la cuarta mezcla de reacción se concentra antes de someterse a la elución en la columna. Según un tercer método alternativo se adiciona celita a la cuarta mezcla de reacción, se concentra hasta sequedad la  
10 mezcla así obtenida y se somete el residuo a una extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico en un extractor "soxhlet" seguida de elución en una columna. El disolvente preferido para la extracción sólido-líquido es acetato de etilo. La columna está seleccionada entre  
15 columnas de filtración con rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, como por ejemplo una columna con relleno de SEPHADEX, columnas de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, como por ejemplo una columna con relleno de BIOGEL, y columnas de filtración de carbón  
20 activo o de carbón activo-celita. Preferentemente la columna es de carbón activo-celita, en la que se desactiva el carbón mediante adición de ácido clorhídrico.

Este tercer método alternativo ofrece la ventaja de eliminar la mayor parte de la xilosa -sobre todo cuando  
25 se usa en gran exceso en la reacción - antes de la elución en la columna con lo cual el relleno, así como la cantidad de primer eluyente que se necesita para la elución es mucho menor. Otra ventaja de este tercer método alternativo es que la extracción sólido-líquido en acetato  
30 de etilo es completamente selectiva puesto que en la fase líquida no se observa presencia de disacáridos, sino únicamente de xilosa y galactosa.

Según un cuarto método alternativo la elución en la quinta etapa se realiza en lugar de utilizando una  
35 columna de relleno, adicionando carbón activo a la cuarta

mezcla de reacción una vez separado el fragmento aglicónico del sustrato en la cuarta etapa, consiguiendo así que la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, se adsorba sobre el carbón activo y eluyendo la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa del carbón activo con un segundo eluyente. Dicha elución se lleva a cabo preferentemente mediante lavados consecutivos con agua y con isopropanol diluido con proporción creciente en volumen de isopropanol en pasos sucesivos. La proporción en volumen de isopropanol está comprendida entre 1% y 3% en un primer paso, entre un 3% y un 5% en un segundo paso, y entre un 5% y un 7% en un tercer paso. La concentración de isopropanol preferida para el lavado es una secuencia de isopropanol al 2%, seguida de elución con isopropanol al 4% y seguida de elución con isopropanol al 6%. Del residuo obtenido por concentración, se obtiene la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa pura cristalizándola en acetona-agua.

Preferentemente, según este cuarto método alternativo se usa o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranósido como sustrato para la reacción.

Según este cuarto método alternativo se obtienen múltiples ventajas tales como que no es necesario calentar la segunda mezcla de reacción a 100°C para detener la reacción, ni tampoco separar el fragmento aglicónico del sustrato en la cuarta etapa mediante extracción. De igual modo, se evita la necesidad de concentrar la cuarta mezcla de reacción, con lo que no se produce caramelización de la misma. Se reduce la cantidad de carbón activo que se necesitaría para el relleno de una columna, se reduce también la cantidad total de eluyentes, y se evita el uso de celita.

De acuerdo con la invención según la sexta etapa se cristalizan las fracciones que contienen 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenidas en una mezcla de

cristalización elegida entre mezclas de acetona/metanol en una relación entre 5/1 a 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación entre 5/1 a 20/1, preferentemente una relación de 10/1.

5 La invención también se refiere a 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante el procedimiento anteriormente descrito, y a composiciones y disoluciones salinas o acuosa, que comprenden una 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante dicho  
10 procedimiento, así como al uso de una 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa en la preparación de composiciones y disoluciones para la evaluación in vivo de lactasa intestinal en humanos.

En tales composiciones y disoluciones, la β-D-galactopiranosil-D-xilosa se combina con cantidades  
15 farmacéuticamente aceptables de al menos un aditivo seleccionado entre estabilizantes, protectores, saborizantes, lactosa, gelificantes, fluidificantes y conservantes, farmacéuticamente aceptables y en sí  
20 convencionales.

La 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa o las composiciones o disoluciones que la contienen, se administran por vía oral y conducen a la aparición en orina de xilosa que, valorada espectrofotométricamente,  
25 se utiliza de manera específica, rutinaria, incruenta y sencilla para la evaluación diagnóstica de las deficiencias en actividad lactasa.

#### **MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

La invención se describirá ahora en base a unos  
30 ejemplos que ilustrarán con más detalle algunas de las características anteriormente descritas.

**Ejemplo 1:** Para determinar la influencia de la temperatura de reacción se realizó el siguiente ensayo:

35 Se prepararon muestras de mezclas de reacción

compuestas por

125mg (500mM) de D-xilosa

25mg (50mM) de o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido

1,75ml de un medio de reacción comprendido

- 5 por una disolución acuosa tamponada a pH 7  
(0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM  
mercaptoetanol),

- 10 a las que se añadieron unidades de enzima  $\beta$ -galactosidasa  
de *E. Coli* en función de las temperaturas de reacción  
aplicadas, de acuerdo con el siguiente esquema:

	temperatura de reacción (°C)	unidades de enzima añadidas (u)
15	45	1,6
	37	1,6
	25	1,6
	5	10
20	-5	20

- 25 Los incrementos en la cantidad de enzima fueron  
necesarios para compensar la ralentización que se produce  
en la reacción por la bajada de la temperatura de  
reacción. Cabe indicar que es posible operar a  
temperaturas debajo del punto de congelación del agua  
gracias al descenso crioscópico que se produce en el  
medio de reacción debido a la alta concentración de  
azúcares en las muestras.

- 30 Se determinó, para cada una de las muestras y para  
cada etapa del procedimiento, la relación entre 4-, 2- y  
3-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa, por cromatografía de  
gases con un cromatógrafo equipado con detector de  
ionización de llama y columna capilar SE-54 de 15 m de  
35 longitud, 0,15mm de diámetro interno y 0,3 $\mu$ m de espesor.

Se empleó un flujo de nitrógeno de 1ml/min. El programa de temperaturas utilizado era:

5            Temperatura inicial:        160°C  
              Tiempo inicial:            2 min  
              Incremento temperatura:    5°C/min  
              Temperatura final:        250°C.

10           Las muestras se analizaron después de trimetilsililación mediante el siguiente protocolo:

15           Una alícuota (10µl) se congeló a -170°C y se liofilizó hasta obtener un residuo seco, tras lo cual se añadió, al residuo seco, piridina (25µl) que contenía como referencia interna bencil β-D-xilopiranosido (10mM) y N-trimetilsilimidazol (25µl), y se continuó la calefacción a 60°C durante 30 minutos. Los tiempos de retención de los picos asignables a los distintos disacáridos fueron los siguientes:

20           Bencil β-D-xilopiranosido:            12,04min  
              2-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa: 18,46 y 19,50min  
              3-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa: 18,30min  
              4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa: 20,35 y 20,50min

25           La siguiente tabla refleja las proporciones tomadas en el máximo de formación de disacáridos, de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa (=compuesto I) frente a la suma de sus regioisómeros 2- y 3-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa que se obtuvieron:

Tabla 1

	<i>Temperatura</i>	<i>Tiempo aproximado de reacción (minutos)</i>	<i>relación compuesto I / compuestos II + III</i>
5	45	90	68:32
	37	150	71:29
	25	180	79:21
	5	270	80:20
	-5	120	83:17

10

De la anterior tabla se desprende que a medida que se bajaba la temperatura, se produjo un aumento en la proporción de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa.

15 **Ejemplo 2:** Para determinar la influencia del pH en la reacción, se prepararon las siguientes muestras:

	Gal-ONP (50mM):	25mg
	D-xilosa (500mM):	125mg
20	Galactosidasa de <i>E.coli</i> :	1,6 u
	Disolución acuosa tamponada (fosfato potásico 50mM, 1mM MgCl <sub>2</sub> , 5mM mercaptoetanol) a pH:	
	8,5	1,6ml
	7	1,6ml
25	5	1,6ml

y se hicieron reaccionar a 37°C.

El progreso de la reacción se siguió del mismo modo que se describe en el ejemplo 1.

30 La siguiente tabla refleja las proporciones de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa (=compuesto I) frente a la suma de sus regioisómeros 2- y 3-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa que se obtuvieron:

Tabla 2

pH	Tiempo aproximado de reacción (minutos)	relación compuesto I / compuestos II + III
8,5	60	68:32
7	150	71:29
5	180	81:19

De la anterior tabla se desprende que en medio básico (pH=8,5), la proporción del compuesto I era menor que en medio neutro (pH=7), detectándose la mayor proporción del compuesto I en medio ácido (pH=5).

**Ejemplo 3:** Para sintetizar 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 6g de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a pH 7 (0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM mercaptoetanol), se añadieron 2mg (640u) de enzima β-galactosidasa de *E.Coli*, y la disolución así obtenida se sometió a incubación a 30° C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 4 horas). El seguimiento de la reacción se llevó a cabo por cromatografía en capa fina con isopropanol/NH<sub>3</sub>(30%)/H<sub>2</sub>O = 7,5/0,5/2,5 como eluyente y tomando como referencia los valores de R<sub>f</sub> siguientes:

R<sub>f</sub>(Gal-ONP): 0,58  
 R<sub>f</sub> (D-xilosa): 0,47  
 R<sub>f</sub> (4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa): 0,17  
 R<sub>f</sub> (2-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa  
 + 3-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa): 0,26

La reacción se paró por calentamiento en baño de agua a 100°C durante 10 minutos, y seguidamente se extrajo el o-nitrofenol formado con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. La disolución acuosa se concentró hasta sequedad y el residuo se acetiló de manera en sí convencional (anhídrido



acético/piridina = 1:1, a temperatura ambiente, durante una noche y con agitación magnética). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se concentró y los restos de piridina y anhídrido acético se eliminaron por adiciones y evaporaciones sucesivas de tolueno. Las sales precipitadas se filtraron, el filtrado se concentró a sequedad y el residuo se cromatografió en columna de gel de sílice utilizando como eluyente un gradiente de hexano/acetato de etilo de 4:1 - 1:1. De la columna se eluyó primero la D-xilosa acetilada y después la mezcla de los disacáridos acetilados. Una vez concentradas las fracciones que contenían la mezcla de disacáridos, el residuo se disolvió en MeOH, se añadió una disolución de MeONa/MeOH 1M, y la mezcla así obtenida se agitó hasta que la desacetilación era completa (seguimiento por tlc con isopropanol/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O). La mezcla se neutralizó con AMBERLITA IR-120 (H<sup>+</sup>) y se concentró hasta sequedad. La mezcla de disacáridos libres se cristalizó dos veces sucesivas con MeOH/acetona, obteniéndose 1,07g de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa pura con un 17% de rendimiento basado en el Gal-ONP inicial. (Punto de fusión: 171-176°C; <sup>1</sup>HRMN (D<sub>2</sub>O): δ 5,17 y 4,58 (2D, 1H, J 3,8 y 7,8Hz, H-1α y H-1β), 4,55 y 4,45 (2d, 1H, J 7.8 Hz, H-1'), 4,05 (dd, 1H, J 5.3 y 11.6Hz, H-5e), 3,38 (dd, 1H, J 10,6 y 11,6 Hz), 3,25 (dd, 1H, J 7,8 y 9,4 Hz, H-2').

**Ejemplo 4:** Se preparó una columna de activo/celita mezclando en seco 200g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150ml de HCl (35%) para desactivar el carbón, así como para lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de cromatografía de 5cm(ø) x 50cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5g de o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a pH 7 (0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM mercaptoetanol), se añadieron 2mg (640u) de enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.Coli*, y se sometió la disolución así obtenida a incubación a 37° C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el ortonitrofenol formado con acetato de etilo. La disolución acuosa se concentró hasta un volumen aproximado de 50ml, se filtró a través de lana de vidrio y se pasó por la columna de carbón activo/celita. En primer lugar se eluyó con agua el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un gradiente fraccionado de EtOH/H<sub>2</sub>O (2%-10% de EtOH) se recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se juntaron y concentraron hasta un volumen reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla sí obtenida en frío. La 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa cristalizó de forma pura, obteniéndose 970mg, es decir, un 19% basado en el Gal-ONP inicial, cuyos datos espectrales coincidieron con los expuestos con respecto al producto obtenido de acuerdo con el ejemplo 3.

**Ejemplo 5:** Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 150ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se

lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de cromatografía de 5cm(Ø) x 50cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5g de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a pH 7 (0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM mercaptoetanol), se añadieron 2mg (640u) de enzima β-galactosidasa de *E.Coli*, y la disolución así obtenida se sometió a incubación a 37° C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el ortonitrofenol formado con acetato de etilo. La disolución acuosa se concentró hasta un volumen de aproximadamente 50ml, se filtró a través de lana de vidrio y se pasó por la columna de carbón activo/celita.

Para cristalizar la 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa, en primer lugar se eluyó con agua el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un gradiente fraccionado de EtOH/H<sub>2</sub>O (2%-10% de EtOH) se recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se juntaron, se concentraron a un volumen reducido y se disolvieron en la cantidad mínima posible de agua, tras lo cual se añadió acetona gota a gota, hasta la aparición de turbidez dejándose cristalizar la mezcla así obtenida a temperatura ambiente durante dos horas. Al cabo de dos horas se comprobó, con una capa fina del sobrenadante (transparente) que aún quedaba una cantidad de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa sin cristalizar. Se volvió a añadir acetona hasta turbidez y se dejó reposar otras dos horas. Finalmente, se añadió más acetona y se almacenó la muestra en nevera durante la noche y se comprobó que el

sobrenadante producido contenía sólo una mínima cantidad de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa. Los cristales de 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se filtraron y lavaron con acetona.

5 La 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se obtuvo de forma pura, obteniéndose 1557mg, es decir, un 30% basado en el Gal-ONP inicial, cuyos datos espectrales coincidieron con los expuestos con respecto al producto obtenido de acuerdo con el ejemplo 3.

10

**Ejemplo 6:** Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 200g de carbón activado (DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 15 150ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de cromatografía de 5cm(Ø) x 50cm, y se compactó.

20

Para sintetizar 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5g de o-nitrofenil β-D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a pH 6,8 (0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM mercaptoetanol), se añadieron 70 unidades de enzima β-galactosidasa de *Kluyveromyces lactis* (MAXILACT®), y la 25 disolución así obtenida se sometió a incubación a 37° C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (aproximadamente 2 horas). La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina 30 con isopropanol/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (7,5/0,5/2,5) resultando los siguientes Rf's:

	Rf(Gal-ONP):	0,58
	Rf (D-xilosa):	0,47
35	Rf (4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,17

Rf (2-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa  
+ 3-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa): 0,26

Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 4,  
5 se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10  
minutos y se extrajo el ortonitrofenol formado con  
acetato de etilo y se filtró para eliminar restos de la  
enzima. La disolución acuosa se concentró a vacío a un  
volumen aproximado de 45ml, y se pasó por columna de  
10 carbón activo/celita. En primer lugar se eluyó con agua  
el exceso de D-xilosa y seguidamente, utilizando un  
gradiente fraccionado de EtOH/H<sub>2</sub>O (2% 10% de EtOH) se  
recogió la mezcla de disacáridos. Las fracciones  
enriquecidas en el regioisómero 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-  
15 D-xilosa se juntaron y se concentraron hasta un volumen  
reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la  
aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla así  
obtenida en frío. La 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa  
cristalizada se filtró por placa filtrante, obteniéndose  
20 817mg, es decir, un 16% basado en el Gal-ONP inicial.

**Ejemplo 7:** Se preparó una columna de carbón  
activo/celita mezclando en seco 200g de carbón activado  
(DARCO G-60) y 200 g de celita, y se añadió agua hasta  
25 que se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con  
150ml de HCl (35%) para desactivar el carbón y lavar  
restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se  
lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron  
neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de  
30 cromatografía de 5cm(Ø) x 50cm, y se compactó.

Para sintetizar 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se  
disolvieron 5g de o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido  
(Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a  
pH 7 (0,05M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM  
35 mercaptoetanol), se añadieron 80 unidades de enzima  $\beta$ -

galactosidasa de *E. coli*, y la disolución así obtenida se sometió a incubación a 37° C en un agitador orbitálico durante 24 horas. La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina con isopropanol/NH<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O (7,5/0,5/2,5) resultando los siguientes Rf's:

	Rf(Gal-ONP):	0,58
	Rf (D-xilosa):	0,47
	Rf (4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,17
10	Rf (2-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa + 3-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa):	0,26

Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos y se extrajo el ortonitrofenol formado con acetato de etilo y se filtró para eliminar restos de la enzima. La disolución acuosa se concentró a vacío hasta un volumen aproximado de 70ml, y la disolución concentrada se eluyó a través de una columna de carbón activo/celita. En primer lugar se eluyó con isopropanol/agua al 2% y se recogieron 1,3 litros. Después se recogieron fracciones al 4% hasta 2,6 litros, utilizándose un volumen total de 3,9 litros.

Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa se juntaron y concentraron hasta un volumen reducido, tras lo cual se añadió acetona hasta la aparición de turbidez dejándose reposar la mezcla así obtenida en frío. La 4-0-β-D-galactopiranosil-D-xilosa cristalizada se filtró por placa filtrante, obteniéndose 1.213mg, es decir, un 24% basado en el Gal-ONP inicial.

**Ejemplo 8:** Se preparó una columna de carbón activo/celita mezclando en seco 24g de carbón activado (DARCO G-60) y 24 g de celita, y se añadió agua hasta que

se formó una pasta homogénea. La pasta se trató con 18ml de HCl (35%) para desactivar el carbón así como lavar restos de hierro y cenizas alcalinas, y posteriormente se lavó con agua hasta que las aguas de lavado salieron neutras. Una vez lavada, se empaquetó en una columna de cromatografía y se compactó.

Para sintetizar 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 5g de o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 25g de D-xilosa en 330ml de agua tamponada a pH 7 (0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM mercaptoetanol), se añadieron 80 unidades de enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.Coli*, y la disolución así obtenida se sometió a incubación a 37° C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (24 horas). La reacción se siguió mediante cromatografía de capa fina con isopropanol/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$  (7,5/0,5/2,5) de manera análoga a la indicada en el ejemplo 7. Siguiendo la metodología expuesta en el ejemplo 3, se paró la reacción por calentamiento a 100°C durante 10 minutos, se dejó enfriar y se extrajo el ortonitrofenol formado con acetato de etilo. A la disolución acuosa se añadió celita (40g) y la mezcla se concentró hasta sequedad. El residuo sólido se sometió a una extracción sólido-líquido usando un extractor "soxhlet" equipado con cartucho de celulosa y usando acetato de etilo (500ml) como disolvente. Al cabo de 23 horas el sólido resultante se lavó con agua (3 x 40 ml) y la disolución acuosa se eluyó a través de la columna de carbón activo-celita. En primer lugar se eluyó con isopropanol/agua al 2% y a continuación con isopropanol/agua al 4%, utilizándose un volumen total de eluyente de 400 ml. Las fracciones enriquecidas en el regioisómero 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se juntaron y concentraron hasta sequedad. El residuo se cristalizó de acetona-agua de manera similar a la descrita en el ejemplo 7, obteniéndose 0,44g de

disacárido puro y cristalino.

**Ejemplo 9:** Para sintetizar 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se disolvieron 4,12g de o-nitrofenol  $\beta$ -D-galactopiranosido (Gal-ONP) y 20,6 g de D-xilosa en 272ml de agua tamponada a pH 7 (0,05M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1mM  $\text{MgCl}_2$ , 5mM mercaptoetanol), se añadieron 66 unidades de enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E.Coli*, y la disolución así obtenida se sometió a incubación a 37°C en un agitador orbitálico hasta que el Gal-ONP prácticamente se consumió (21 horas). La reacción se detuvo por enfriamiento a 0°C y se filtró el o-nitrofenol como un sólido. Al filtrado se le añadieron 60 g de carbón activo y la mezcla resultante se agitó durante 30 min. Por medio de tlc del sobrenadante se observó la ausencia de disacárido en disolución, al estar adsorbido sobre el carbón activo. La mezcla se filtró y el sólido de carbón activo se lavó con agua (400 ml), isopropanol al 2% (100 ml), isopropanol al 4% (200 ml) e isopropanol al 6% (200 ml). Las fracciones que contenían disacárido 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se concentraron y el residuo (2,38 g) se cristalizó de acetona-agua obteniéndose 1,55 g de un sólido que se cristalizó de nuevo de la misma mezcla de disolventes de manera análoga a la del ejemplo 7. Se obtuvieron 1,32 g de disacárido puro (32%).



### REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento enzimático para obtener 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa que comprende  
una primera etapa en la que se prepara una primera  
5 mezcla de reacción de  
2-20 % en peso de D-xilosa  
0,5-5% en peso de un sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido  
75-97,5 % en peso de un medio de reacción que  
10 comprende agua tamponada a un pH entre 5.0 y 9.0;  
añadiéndose 10 a 1.000 unidades de una enzima  $\beta$ -D-galactosidasa, por gramo de  $\beta$ -D-galactopiranosido a la primera mezcla de reacción; y obteniéndose una segunda mezcla de reacción;  
15 una segunda etapa en la que la segunda mezcla de reacción se somete a una reacción a una temperatura comprendida entre una temperatura superior al punto de congelación de la segunda mezcla de reacción y 45°C, durante 2 a 48 horas, para formar disacáridos en la  
20 segunda mezcla de reacción;  
una tercera etapa en la que se para la reacción cuando se han formado los disacáridos en la cantidad deseada, mediante un tratamiento elegido entre una desactivación de la  $\beta$ -D-galactosidasa por congelación de  
25 la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre -20°C y -170°C, una desactivación de la  $\beta$ -D-galactosidasa por calentamiento de la segunda mezcla de reacción a una temperatura entre 95 y 110°C, y una separación de la  $\beta$ -D-galactosidasa de la segunda mezcla de reacción por  
30 ultrafiltración; obteniéndose una tercera mezcla de reacción;  
una cuarta etapa en la que se separa de la tercera mezcla de reacción, mediante extracción o filtración, un fragmento aglicónico del sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido  
35 usado en la primera etapa; obteniéndose una cuarta mezcla

de reacción;

una quinta etapa en la que se aíslan fracciones que contienen 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa,

**caracterizado**

5        porque, la quinta etapa se selecciona entre una  
adición de celita a la cuarta mezcla de reacción, seguida  
de extracción sólido-líquido con un disolvente y elución  
con un primer eluyente en una columna; y una adición  
10        directa de carbón activo a la cuarta mezcla de reacción  
seguida de filtración y elución con un segundo eluyente,  
y porque en una sexta etapa, las fracciones que  
contienen 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se  
cristalizan en una mezcla de cristalización seleccionada  
entre mezclas de acetona/metanol en una relación entre  
15        5/1 a 20/1, y mezclas de acetona/agua en una relación  
entre 5/1 a 20/1.

2. Procedimiento según la reivindicación 1,  
caracterizado porque la cuarta mezcla de reacción se  
20        concentra antes de someterse a la elución en la columna.

3. Procedimiento según la reivindicación 1,  
caracterizado porque la mezcla de acetona/metanol presenta  
una relación de 10/1.

25        4. Procedimiento según la reivindicación 1,  
caracterizado porque la mezcla de acetona/agua presenta  
una relación de 10/1.

30        5. Procedimiento según la reivindicación 1,  
caracterizado porque el primer eluyente es una mezcla de  
agua/isopropanol que contiene 1 a 10% (v/v) de  
isopropanol.

35        6. Procedimiento según la reivindicación 1,

caracterizado porque la mezcla agua/isopropanol contiene un 2% (v/v) de isopropanol.

5 7. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la quinta etapa consiste en la adición de celita a la cuarta mezcla de reacción y concentración hasta sequedad, seguida de una extracción sólido-líquido con un disolvente orgánico en un extractor soxhlet que lleva un cartucho de un material compatible con dicho disolvente,  
10 y elución con un primer eluyente en una columna seleccionada entre columnas de filtración con rellenos de polímeros de dextranos entrecruzados, columnas de filtración con rellenos de polímeros de acrilamida, columnas de filtración de carbón activo o columnas de  
15 carbón activo-celita.

8. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el disolvente es acetato de etilo.

20 9. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque el disolvente se usa en una cantidad comprendida entre 10 ml y 25 ml por gramo de xilosa inicial.

25 10. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la celita se usa en una cantidad comprendida entre 1g y 2g por gramo de xilosa inicial.

30 11. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque la columna es de carbón activo-celita en la que se desactiva el carbón mediante adición de ácido clorhídrico al 35%.

35 12. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque la celita se usa en una cantidad comprendida entre 0,5g y 2g de celita por gramo de xilosa

inicial.

13. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el carbón activo se usa en una  
5 cantidad comprendida entre 0,5g y 2g de carbón activo por gramo de xilosa inicial.

14. Procedimiento según la reivindicación 7, caracterizado porque dicho primer eluyente se usa en una  
10 cantidad comprendida entre 5 ml y 25 ml por gramo de xilosa inicial.

15. Procedimiento según la reivindicación 11, caracterizado porque el ácido clorhídrico se usa en una  
15 cantidad comprendida entre 0,5ml y 1,5ml por gramo de xilosa inicial.

16. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque en la quinta etapa la cuarta mezcla  
20 de reacción se somete a una adición directa con al menos un segundo eluyente sobre carbón activo en la que la 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se adsorbe sobre el carbón activo y el segundo eluyente es agua seguido de  
25 isopropanol diluido con proporción creciente en volumen de isopropanol en pasos sucesivos.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque la proporción en volumen de  
isopropanol está comprendida entre 1% y 3% en un primer  
30 paso, entre un 3% y un 5% en un segundo paso, y entre un 5% y un 7% en un tercer paso.

18. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque el carbón activo se usa en una  
35 cantidad comprendida entre 2g y 4g de carbón activo por

gramo de xilosa inicial.

19. Procedimiento según la reivindicación 16, caracterizado porque el segundo eluyente se usa en una  
5 cantidad total comprendida entre 30ml y 50ml de segundo eluyente por gramo de xilosa inicial.

20. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 16, caracterizado porque la reacción se para por enfriamiento  
10 de la segunda mezcla de reacción a 0°C.

21. Procedimiento según la reivindicación 1, 16, y 20, caracterizado porque la cuarta mezcla de reacción se  
15 obtiene por separación del fragmento aglicónico de sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido mediante filtración.

22. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proporción de D-xilosa en la  
20 segunda mezcla de reacción es de 7,5% en peso.

23. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la proporción del  $\beta$ -D-galactopiranosido en la segunda mezcla de reacción es de  
25 1,5% en peso.

24. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque se añaden 20 unidades de  $\beta$ -D-galactosidasa, por gramo de  $\beta$ -D-galactopiranosido.

25. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el medio de reacción comprende  
30 además al menos un medio codisolvente seleccionado entre dimetilsulfóxido, dimetilformamida, dioxano y mezclas de los mismos.

35

26. Procedimiento según la reivindicación 25, caracterizado porque el medio de reacción comprende el 20% en peso del medio co-disolvente.
- 5 27. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la reacción se lleva a cabo a temperatura constante.
- 10 28. Procedimiento según la reivindicación 1 ó 27, caracterizado porque la temperatura de reacción es de -5°C a 40°C.
- 15 29. Procedimiento según la reivindicación 1, o 27, caracterizado porque la temperatura de reacción es superior a la temperatura de congelación de la segunda mezcla e inferior a 0°C.
- 20 30. Procedimiento según la reivindicación 1, 28 o 29, caracterizado porque la temperatura de reacción es de -5°C.
- 25 31. Procedimiento según la reivindicación 1 o 28, caracterizado porque la temperatura de reacción es temperatura ambiente.
- 30 32. Procedimiento según la reivindicación 1, 26 o 27, caracterizado porque el medio de reacción está tamponado a pH 7.
33. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante congelación de la segunda mezcla de reacción a una temperatura de -78°C.
- 35 34. Procedimiento según la reivindicación 1,

caracterizado porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante calentamiento de la segunda mezcla de reacción hasta una temperatura de 100°C.

- 5 35. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque, en la tercera etapa, la reacción se para mediante una separación de la  $\beta$ -D-galactosidasa por ultrafiltración.
- 10 36. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el sustrato  $\beta$ -D-galactopiranosido se selecciona entre o-nitrofenil  $\beta$ -D-galactopiranosido y lactosa.
- 15 37. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima  $\beta$ -galactosidasa es  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli*.
- 20 38. Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la enzima  $\beta$ -galactosidasa es  $\beta$ -galactosidasa de *Kluyveramyces lactis*.
- 25 39. Una 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa caracterizada porque se ha obtenido mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38.
- 30 40. Una composición para la evaluación in vivo de la lactasa intestinal en humanos, caracterizada porque comprende una 4-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38.
- 35 41. Una disolución para la evaluación in vivo de la lactasa intestinal en humanos, caracterizada porque comprende es una disolución seleccionada entre soluciones

acuosas y soluciones salinas, de una 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa obtenida mediante el procedimiento definido en cualquiera de las reivindicaciones 1-38..

5

42. Uso de 4-0- $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa preparada según cualquiera de las reivindicaciones 1-38, en la preparación de una composición para la evaluación in vivo de lactasa intestinal en humanos.

10

43. Uso de  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa preparada según cualquiera de las reivindicaciones 1-38, en la preparación de una disolución seleccionada entre soluciones salinas y soluciones acuosas, para la

15

44. Uso según la reivindicación 42 o 43, caracterizado porque la  $\beta$ -D-galactopiranosil-D-xilosa se combina con cantidades farmacéuticamente aceptables de al menos un aditivo seleccionado entre estabilizantes, protectores, saborizantes, lactosa, gelificantes, fluidificantes y conservantes.

20

25